甲醇周期诱导控制强化毕赤酵母生产猪α干扰素*

严　建　贾禄强　丁　健　史仲平**

（ 江南大学生物工程学院　工业生物技术教育部重点实验室　无锡　214122 ）

摘要　利用甲醇营养型毕赤酵母生产猪α干扰素（pIFN-α），诱导过程一般在高细胞密度、定值控制甲醇浓度于 5-10 g/L 下进行，此时、溶解氧浓度（DO）自然下降到接近于 0 的水平。如果高好氧的毕赤酵母长期处在高甲醇/低 DO 的诱导浓度环境会导致其代谢活性恶化；胞内甲醇积累严重；pIFN-α表达生产效率低。为此，提出了一种甲醇周期诱导控制策略来强化 pIFN-α生产。先将甲醇控制于高浓度达 7 h；再降低甲醇流加速率、将 DO 控制在~20%约 4 h，一共重复 6 个循环。采用上述周期控制策略，毕赤酵母代谢活性可以长期维持在较高水平；胞内甲醇处于极低水平（≤ 0.003 g/g-DCW）、解除了甲醇毒性效应；pIFN-α活性达到 3.90×10^{7} IU/mL 的最高水平，是定值控制甲醇浓度时的 1.86 倍。

关键词　毕赤酵母　甲醇　周期控制　DO　pIFN-α

中图分类号　Q815

将状态变量（如浓度、细胞比生长速度/底物比消耗速度等）定值控制在恒定水平，是实现发酵过程优化的最常见的控制方法。但是，周期控制（periodic control）、无论是自发的（self-generated）还是强制型的（forced），在某些特定情况下比定值控制具有明显的优势。所谓周期控制，就是将状态变量以一定的周期/频率、从一个状态（环境）切换成另一个不同的状态，并具有一定数量的周期重复循环次数。

周期控制在发酵过程控制领域也有一定的应用和研究报道。Cheng 等[1]利用带遗传质粒的 *Saccharomyces cerevisiae* 分批补料发酵生产β-半乳糖苷酶，并分析了低葡萄糖浓度（饥饿）对携带质粒细胞和无质粒细胞的影响。由于无质粒细胞对环境变化的反应要快于带遗传质粒的细胞，因此在葡萄糖充足的环境中生长快于带遗传质粒的细胞；当葡萄糖耗尽的时候，其死亡或者裂解速率更快。根据上述特性，利用周期控制策略周期地将葡萄糖浓度从“过量”向“饥饿”状态进行切换，即间隔一定的时间（~6 h）补加葡萄糖达到 1 g/L，重复 4-5

收稿日期：20xx-xx-xx　　　　修回日期：20xx-xx-xx

*　国家自然科学基金资助项目（ 21606106 ）；江苏省自然科学基金资助项目（ BK20150127；BK20160162 ）

** 通讯作者，电子信箱：zpshi@jiangnan.edu.cn

个周期。与传统分批发酵批次的最高产量相比，细胞质粒脱落率可控制在较低水平（12%），细胞总浓度增加了32.8%，β-半乳糖苷酶的产量提高了80.6%。Ye等[2]利用*Propionibacterium freudenreichii*发酵生产维生素B_{12}，发现细胞在厌氧环境中生长较快，但是长期在厌氧环境中培养，生成的丙酸浓度较高，会抑制细胞生长；丙酸虽然能在有氧环境中被细胞氧化分解，但细胞长期处在有氧环境下会造成细胞生长速率和产物合成大幅下降。因此，采用了一种周期性切换有氧/厌氧环境的方法来解决上述问题。与传统厌氧发酵相比，利用上述“周期控制”发酵的细胞浓度提高了189%，丙酸被控制在较低水平（5.08 g/L→2.78 g/L），维生素B_{12}产量提高了一倍左右。申渝等[3]在高浓度乙醇连续发酵过程中，将稀释速率由0.027 h^{-1}切换至0.04 h^{-1}时，后续的发酵过程处于周期振荡状态；而将起始稀释速率直接设定为0.04 h^{-1}，则发酵过程可以达到稳态。与稳态过程相比，周期振荡发酵过程的平均残糖浓度降低了14.8%、乙醇浓度增加了12.6%、生产强度提高了12.3%。马善康等[4]通过大幅改变发酵环境、利用双碳源（甲醇/甘油）交替刺激毕赤酵母高效表达人尿激酶原，5L罐的发酵结果表明，与对照相比（单纯流加甲醇），双碳源交替刺激法的人尿激酶原酶活可以提高57%。

甲醇营养型毕赤酵母(Methylotrophic *Pichia pastoris*)广泛用于异源蛋白的表达生产[5-7]，诱导表达一般在高细胞密度下进行。在Mut^S型毕赤酵母表达猪α干扰素（pIFN-α）的过程中，通常甲醇浓度控制在5-10 g/L。由于毕赤酵母培养是高度好氧系统，如果细胞长期处于恒定/高甲醇浓度的环境，会造成溶解氧浓度（DO）一直处于接近于0（饱和度0%）的状态。这一方面造成细胞代谢活性的下降，另一方面由于O_2匮乏、胞内甲醇代谢的第一步氧化反应—甲醇+O_2→甲醛无法正常进行，毒性物质甲醇在胞内积累严重，目标蛋白的诱导表达效率较低。为此，本研究提出一种新颖的周期甲醇诱导控制策略，以不同的周期长度将甲醇浓度和DO控制在“高/低”和“低/高”的水平，并来回切换。目的是维持重组毕赤酵母的代谢活性、缓解甲醇在胞内的积累、提升甲醇的诱导效率，最终提高pIFN-α浓度及其抗病毒活性。与此同时，通过将该周期甲醇诱导控制的发酵性能与甲醇浓度（8-10 g/L）和DO（DO~20%）定值控制下的性能进行对比，验证该周期控制策略的有效性，为毕赤酵母高效表达异源蛋白的过程控制提供一些有用信息。

1　材料与方法

1.1　实验菌株和培养基

菌株：重组巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）KM71H（IFNα-pPICZαA）菌株，由上

海市农业科学院畜牧兽医研究所重点实验室构建。

平板活化培养基 (g/L)：葡萄糖 20，蛋白胨 20，酵母粉 10，琼脂 20，pH 自然。

种子培养基 (g/L)：葡萄糖 20，蛋白胨 20，酵母粉 10，pH 自然。

5L 罐发酵初始培养基（g/L）：甘油 20 mL/L，$MgSO_4$ 1，K_2SO_4 1，$(NH_4)_2SO_4$ 5，$CaSO_4$ 0.1，H_3PO_4 2% (V/V)，PTM_1 10 mL/L，pH 6.0。

甘油流加培养基 (g/L)：甘油 500 mL/L，$MgSO_4$ 0.03，$(NH_4)_2SO_4$ 0.5，KH_2PO_4 0.5，PTM_1 10 mL/L，pH 6.0。

诱导流加培养基 (g/L)：纯甲醇 + 10 mL/L PTM_1，pH 5.5。

1.2 实验方法

1.2.1 种子培养

从 YPD 固体平板上挑取米粒大小的菌体，接种于装有 50 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中。在摇床上、30 ℃、220 r/min 的条件下，培养 24 h，作为罐发酵的种子液。

1.2.2 5 L 发酵罐高细胞密度分批补料培养

毕赤酵母分批补料培养在 5 L 发酵罐（上海保兴公司，BIOTECH-5BG），配有 pH/DO 电极（瑞士梅特勒公司）中进行。初始装液量为 2.3 L，接种量为 13%（V/V）。培养开始后，通气量控制在 3 vvm（空气），初始搅拌转速为 300 rpm，手动提高搅拌转速将 DO 始终维持在 10%以上。当初始培养基中的甘油消耗殆尽后，采用改进型 DO-Stat[8]控制策略进行甘油流加。如果使用最大搅拌转速（700 rpm），DO 下部基线仍不能维持在 10%以上则通入纯氧来供氧。用 5%（V/V）的氨水将 pH 维持在 6.0，培养温度控制在 30 ℃。在细胞达到高密度~125 g-DCW/L（OD_{600}≈500）后（培养时间约 25 h），停止甘油流加。再经过 1~2 h 的“饥饿培养”，完全耗尽发酵液中残留的甘油。

1.2.3 利用重组 *Pichia pastoris* 的甲醇诱导发酵生产 pIFN-α

“饥饿培养”结束时，DO 急剧上升。此时首先将纯氧切换成空气进行通气，并将温度和 pH 分别控制在 20 ℃和 5.5。利用低温加热循环槽（上海一恒科技有限公司，MP-10C）控制诱导温度。添入少量甲醇，待 DO 开始下降、OUR（氧气消耗速度）开始上升，细胞开始适应甲醇存在的环境后，正式流加诱导培养基、启动甲醇诱导。甲醇诱导控制策略一共有 3 个：（1）甲醇浓度定值控制（诱导策略 I），利用甲醇电极在线检测系统（华东理工大学，FC-2002）、以 ON-OFF 的方式全程在线控制甲醇浓度在 5-10 g/L 的范围内。（2）DO

定值控制（诱导策略 II）。利用工控机（台湾研华科技股份有限公司，EVOC 810A）和内置的 AD-DA 数据接口/转化卡(台湾研华科技股份有限公司，PCL-812PG)，驱动程序可调式蠕动泵（河北保定兰格公司，BT00-50M），以极低的速度流加甲醇（$F = F^* + K_c \times (DO - DO_{set})$，$F \geqslant 0$），全程将 DO 控制在其设定值（$DO_{set}$=20%）附近。这里，$F$ 是甲醇流加速度，F* 是“基准”流加速度（F* = 0.7 mL/min），控制参数 K_c 设定在 0.05。（3）甲醇周期诱导控制（发酵环境在“高甲醇浓度/低 DO”和“高 DO/低甲醇浓度”间来回切换，诱导策略 III），将甲醇浓度和 DO 分别控制在 5-10 g/L/~0%和 0 g/L/~20%左右的水平，并按照一定的“环境周期长度”来回切换，维持 5-6 个循环，使总诱导时间达到 70~80 h。

1.2.4　分析测定方法

利用分光光度仪（尤尼柯（上海）仪器有限公司，7200 型）测定在波长 600 nm 处的吸光值（OD_{600}），根据细胞干重（g-DCW/L）与 OD_{600} 吸光值的线性关系（g-DCW/L=0.25×OD_{600}），确定细胞干重 g-DCW/L。发酵液中的甲醇浓度由气相色谱仪（上海精密科学仪器有限公司，GC112A，FID 检测器；Alpha-Col AC20 毛细管柱，澳大利亚 SGE 公司）测定，测定方法同文献[9]。胞内甲醇浓度的测定，首先按 Suye 等[10]所报道的方法进行细胞破壁、离心后得到无细胞的酶液，然后通过气相色谱仪测定，方法同上述发酵液中甲醇浓度的测定。比甲醇消耗速率计算方法与参考文献[11]相同，利用与工控机/AD-DA 数据采集转化卡连接的电子天平（上海海康电子仪器厂，JA1102）计量诱导培养基装液瓶的重量损失得到。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳（Bio-Rad 小型垂直电泳，美国伯乐公司）对 pIFN-α 定性分析，测定方法同文献[12]。经过聚丙烯酰胺凝胶电泳分析后，通过 G:Box 生物成像系统和基因工具软件 (英国 SynGene 公司) 对发酵 pIFN-α的浓度进行定量。pIFN-α抗病毒活性测定方法同文献[13]。利用尾气分析仪（韩国 LOKAS 公司，LKM2000A）在线检测尾气中 O_2 和 CO_2 分压，氧气消耗速率（OUR）、二氧化碳释放速率（CER）通过标准计算公式[14]确定。醇氧化酶（AOX）活性按 Suye 等[10]所报道的方法进行测定。这里，AOX 活性定义为：每分钟由甲醇生成 1 μ-mol H_2O_2 为 1 个酶活单位 U。甲醛脱氢酶（FLD）和甲酸脱氢酶（FDH）活性按文献[15]所报道的方法进行测定。以上测量（在线测量除外）均进行 3 次平行测定，取其平均值作为最终的测定值。

2　结果与讨论

2.1　定值控制甲醇条件（诱导策略 I）下的 pIFN-α诱导表达性能

当细胞浓度达到~125 g-DCW/L，启动甲醇定值控制策略（批次#1），将甲醇浓度控制在5-10 g/L，DO 在诱导开始 3~5 h 后降低到 0%水平。pIFN-α浓度逐渐上升、但在诱导 60 h 后开始下降，最终的细胞浓度、pIFN-α浓度和抗病毒活性分别为 150 g-DCW/L、0.79 g/L 和 2.10×10^7 IU/mL（图 1）。图 2 是实施不同诱导控制策略时、pIFN-α的 SDS-PAGE 分析结果。如图 2 所示，随着诱导的进行（诱导时间增大），目标蛋白 pIFN-α条带（16KDa）的强度（pIFN-α蛋白浓度，Run#1）也有所增加，但增强幅度不大。

前期研究表明[16]，在低温 20 ℃下进行诱导，催化甲醇代谢的第 1 个酶、醇氧化酶 AOX 的活性高，目标蛋白产量大，胞外蛋白酶分泌量小、目标蛋白不易降解，发酵性能改善明显。但此时 O_2 的需求量更大、整个诱导期，DO 基本上全程在接近于 0%的极低水平下徘徊。毕赤酵母中的甲醇代谢有两条途径：甲醛异化产能途径和目的蛋白合成途径[12,17]。外添的甲醇首先进入到细胞质中，然后在过氧化物酶体中、通过醇氧化酶 AOX 的催化，氧化生成甲醛。部分中间产物甲醛从过氧化物酶体脱离后，进入异化产能途径（Pathway A），首先由甲醛脱氢酶（FLD）转化为甲酸，甲酸再由甲酸脱氢酶（FDH）彻底氧化为 CO_2、向胞外释放。与此同时，该途径产生出大量 NADH 为同化途径提供能量支撑。另一部分甲醛则进入蛋白合成途径（同化途径，Pathway B），合成目标异源蛋白。但是，（1）AOX 活性在低温诱导下大幅提高，导致耗氧更加剧烈，极低的 DO 水平使得甲醇→甲醛的氧化反应难以高效进行；（2）甲醇在胞外/胞内存在浓度梯度，当甲醇控制浓度处于高水平（8-10 g/L）时，外部甲醇会不断进入胞内，而甲醇→甲醛的氧化反应又不能高效进行、导致胞内甲醇的严重积累，造成“甲醇中毒”现象、pIFN-α诱导表达性能下降。此时胞内甲醇浓度最高可达 0.01387 g/g-DCW（图 3b）；（3）如果利用通纯 O_2 方式，能将 DO 控制在较高水平、甲醇→甲醛的氧化反应得以高效进行，且异化产能途径中的 FLD 和 FDH 的酶活又远远高于 AOX 的酶活（图 3-图 4），毕赤酵母中的（中间）毒性物质甲醇、甲醛和甲酸可全部氧化/利用，其积累可大大缓解，pIFN-α诱导表达性能得以进一步提升[12]；（4）同时利用纯 O_2 和甲醇虽然可以提高目标异源蛋白的表达水平，但它存在操作成本高、存在安全隐患等诸多问题。因此，需要开发低成本、更高效、无安全隐患的新型甲醇诱导控制系统。

周期甲醇诱导控制有解决上述问题的可能：（1）将甲醇浓度降低到~0 g/L 水平后，胞外 DO 迅速上升、O_2 可迅速进入到胞内，使得细胞代谢活性得以恢复；（2）此时胞外甲醇匮乏、无法再向胞内扩散，这可使胞内原来大量聚集的甲醇得到利用（于氧化产能/目标蛋

白合成)，缓解“甲醇中毒”效应、降低胞内甲醇浓度，维持实质性的甲醇诱导；(3) 待胞内甲醇基本消耗殆尽、再迅速将发酵液中的甲醇浓度提高到高水平，继续/重复维持正常甲醇诱导。

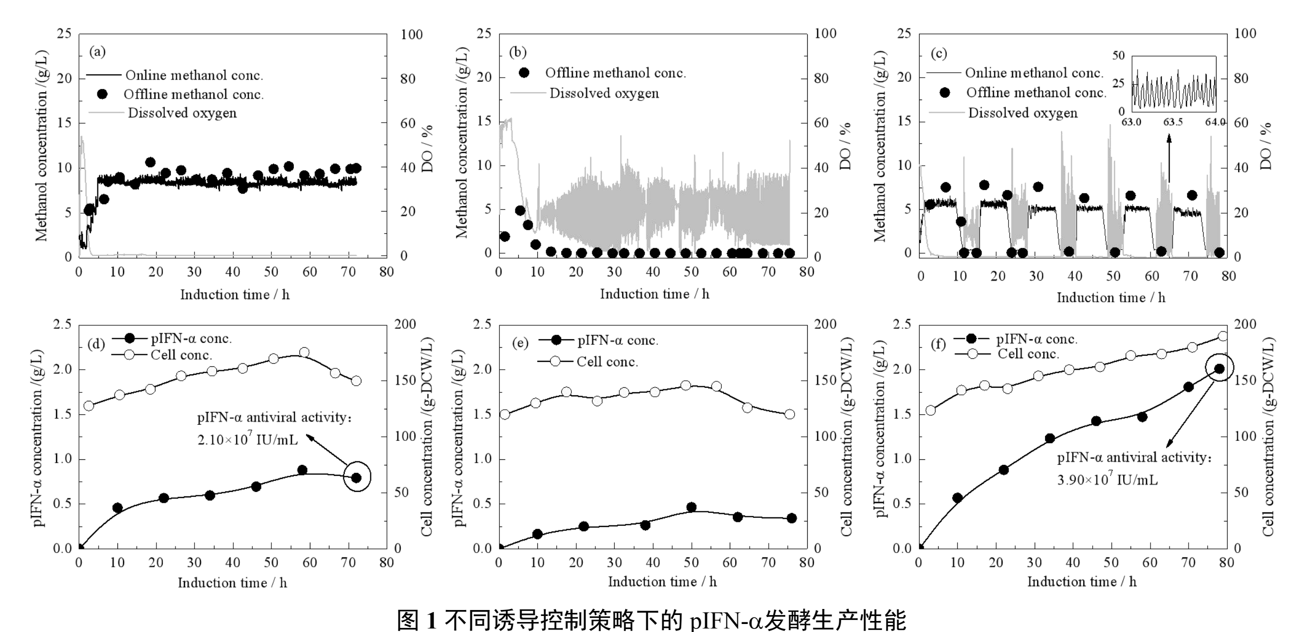


图 1 不同诱导控制策略下的 pIFN-α发酵生产性能

Fig.1 pIFN-α production performance using different induction control strategies

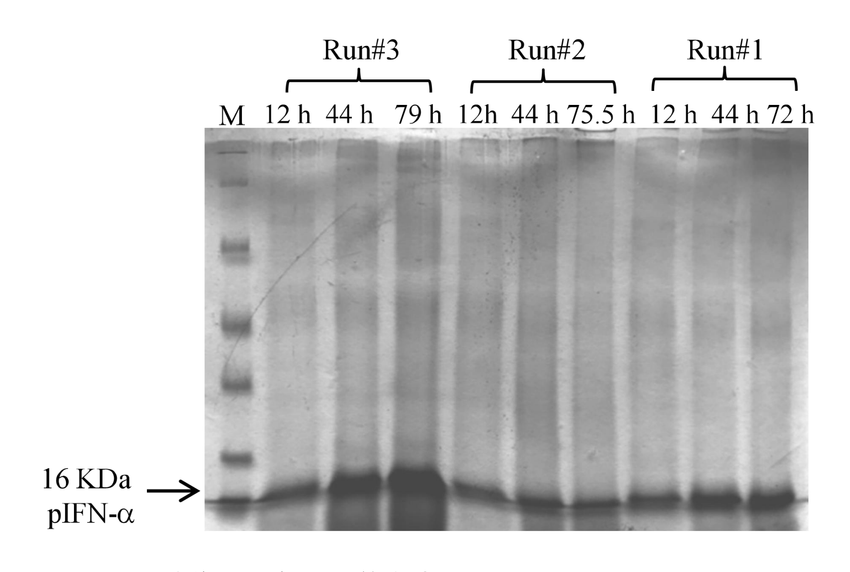


图 2 实施不同诱导控制策略时 pIFN-α的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.2 SDS-PAGE analysis result of pIFN-α using different induction control strategies

2.2 定值控制 DO 条件（诱导策略 II）下的 pIFN-α诱导表达性能

以前述的、极低速率流加甲醇（$F = F^* + K_c \times (DO - DO_{set})$，$F \geq 0$），将 DO 大致控制在 20%左右。使用该策略（诱导策略 II，批次#2）可将 DO 维持在 10%~35%，发酵液中的甲醇浓度几乎全程停留在 0.0-1.0 g/L 的低水平。诱导 76 h，最终细胞浓度、pIFN-α浓度仅有

120.3 g-DCW/L 和 0.34 g/L（图 1）。目标蛋白 pIFN-α的条带的强度（pIFN-α蛋白浓度，图 2-Run#2）几乎没有加深，pIFN-α无法正常表达。根据所报道的甲醇代谢机制，较高的 DO 控制水平，理论上可以使甲醇→甲醛的氧化反应正常进行，但发酵液中的甲醇浓度却又太低，胞外/胞内的浓度梯度小、外部甲醇无法进入胞内，使得胞内甲醇浓度过低，甲醇→甲醛的氧化反应难以正常进行。因此，pIFN-α诱导表达性能远低于使用"诱导策略 I"时的水平。

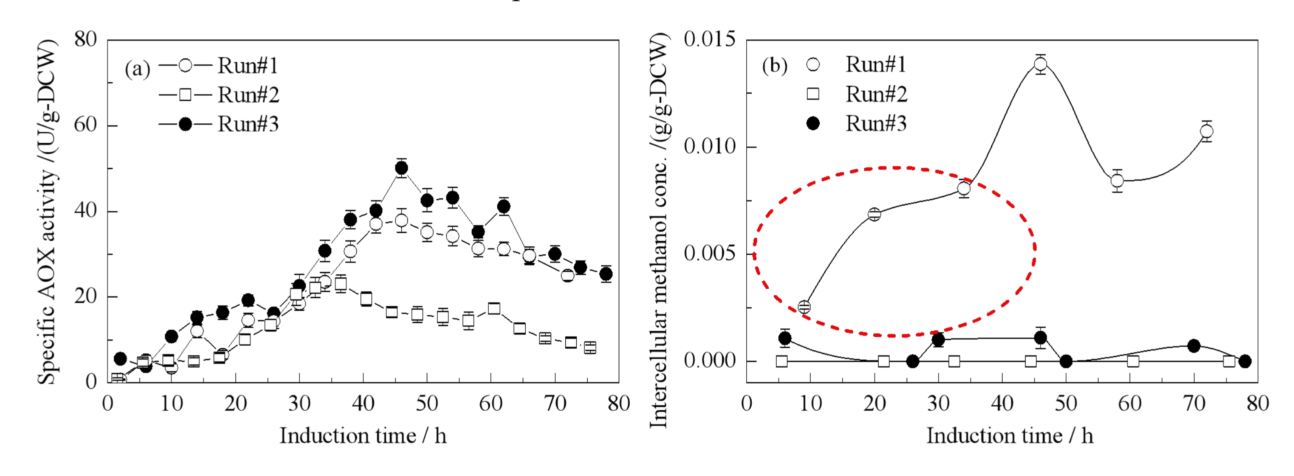


图 3 不同诱导策略下胞内 AOX 活性变化和甲醇积累情况

Fig.3 Variations/accumulation of Intracellular AOX activities and methanol concentration using different induction control strategies

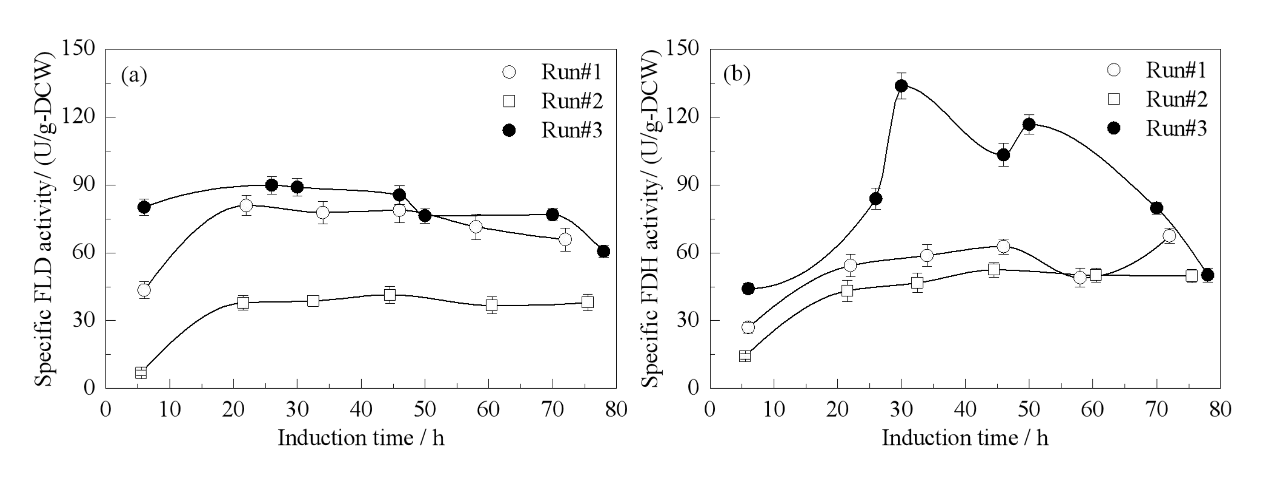


图 4 不同诱导策略下胞内 FLD 和 FDH 活性变化情况

Fig.4 Variations of Intracellular FLD and FDH activities using different induction control strategies

2.3 甲醇周期诱导控制（诱导策略 III）下的 pIFN-α诱导表达性能

如前所述，甲醇周期诱导控制就是要让发酵环境在"高甲醇浓度/低 DO"和"高 DO/低甲醇浓度"间来回切换（诱导策略 III，批次#3）。

2.3.1 甲醇周期诱导控制不同状态切换/维持周期长度的确定

不同于化学反应，生物反应对操作变量（甲醇流加速度等）变化的时间响应较慢。对

于本发酵系统而言，通过快速添加纯甲醇、提升发酵液中的甲醇浓度（至设定水平）的速度较快、耗时较短，但通过消耗甲醇、将甲醇从高浓度下降到低浓度则耗时较长。这也是本甲醇周期诱导控制策略在 20℃下实施的一个原因，因为此时 AOX 活性高、甲醇消耗速度相对较快。

$$\Delta C_{MeOH}^{IC} = K_{DF} \times (C_{MeOH} - \overline{C}_{MeOH}^{IC}) \times T - C_{MeOH} \times r_{MeOH} \times T \quad (1a)$$

$$\Delta C_{MeOH}^{IC} \approx K_{DF} \times C_{MeOH} \times T - C_{MeOH} \times r_{MeOH} \times T \quad (1b)$$

由于所有与甲醇相关的反应都是在胞内进行的。在此，我们提出了一个有关甲醇胞内积累的简单公式（公式 1a）。这里，C_{MeOH}、$\overline{C}^{IC}_{MeOH}$、ΔC^{IC}_{MeOH}、r_{MeOH} 和 T 分别是发酵液中的甲醇浓度（g/g-DCW），胞内甲醇平均浓度（g/g-DCW），特定诱导时间内胞内甲醇浓度的增量（g/g-DCW），甲醇比消耗速度（1/h）和诱导时间间隔（h）。K_{DF} 是甲醇从胞外向胞内的扩散系数（1/h）。由于胞外甲醇浓度远大于其胞内浓度，公式 1a 可进一步简化成公式 1b（忽略 $\overline{C}^{IC}_{MeOH}$）。我们根据公式 1b 并选取发酵批次#1（甲醇浓度定值控制）的实验数据（图 3b 和图 5a）来确定扩散系数 K_{DF}。ΔC^{IC}_{MeOH}、C_{MeOH}、r_{MeOH} 和 T 分别为 0.005g/g-DCW（0.0025→0.0075，图 3b）、0.064（g/g-DCW, ≈8/125=0.064，8 g/L 甲醇对 125 g-DCW/L 细胞）、0.025 h^{-1} 和 25 h（10 h~35 h，批次#1，图 3b 和图 5a），可计算得到甲醇从胞外向胞内的扩散系数 K_{DF} 为 0.028 h^{-1}。为简单起见，在确定不同诱导状态的周期长度时，假定：（1）在高浓度甲醇（8-10 g/L）的诱导条件下，单个（循环）周期 T_1 内、胞内甲醇浓度增量最多不允许超过 0.001 g/g-DCW（ΔC^{IC}_{MeOH}=0.001），C_{MeOH} 和 r_{MeOH} 分别为 0.064 g/g-DCW 和 0.025 h^{-1}。根据公式 1b，高浓度甲醇下的诱导周期长度 T_1 应控制在 5.2 h。（2）在低浓度甲醇（0-1 g/L）的诱导条件下，单个周期 T_2 内、胞内甲醇浓度减量控制在 0.001 g/g-DCW 左右（ΔC^{IC}_{MeOH} = -0.001），C_{MeOH} 和 r_{MeOH} 分别为 0.032 g/g-DCW（使用该时段内发酵液中甲醇的平均浓度）和 0.010 h^{-1}（图 5a），且规定胞外甲醇不继续扩散进入胞内。根据公式 1b，计算得到低浓度甲醇下的诱导周期长度 T_2 应为 3.1 h。高/低甲醇浓度下的诱导周期长度比为 1.68。根据以上理论模拟数据和本发酵系统的实际情况，最后我们将高/低甲醇浓度下的实际诱导周期长度 T_1 和 T_2 分别确定为 7 h 和 4 h，相应的诱导周期长度比为 1.75。

2.3.2 甲醇周期诱导控制策略强化甲醇的利用速度和细胞代谢活性

文献报道指出[18]，甲醇比消耗速率大小可以反映甲醇在胞内的代谢情况。一般情况下、甲醇比消耗速率高，目标蛋白的产量也高。图 5a 比较了三个不同发酵批次的甲醇比消耗速

率的变化情况。使用甲醇周期诱导控制策略（批次#3）时的甲醇平均比消耗速率是最高的（0.0245 h^{-1}），甲醇浓度定值控制的次之（0.0220 h^{-1}），DO 定值控制条件下的甲醇平均比消耗速率最低（0.0105 h^{-1}），不到其他两个批次的一半。图 5b 和图 5c 比较了批次#1（甲醇浓度定值控制）和批次#3（甲醇诱导周期诱导控制）的 OUR 和 CER 水平（批次#2 的呼吸活性太低，数据未显示）。批次#1 的 OUR 和 CER 在诱导 15 h 后达到稳定值，之后呈现出逐渐下降的趋势；批次#3 的 OUR 和 CER 随着发酵环境条件的不断切换、呈现出周期性变化的趋势，但两者的水平总体水平仍然高于批次#1 的相应水平。且两个批次的呼吸熵 RQ 基本相同、均稳定在 0.4-0.5 之间（图 5d），这说明甲醇周期控制发酵过程中的异化供能途径和同化途径同时得到了强化。CER 产生于甲醛异化供能途径（Pathway A）中、并释放出 NADH；而 OUR 则用于甲醇→甲醛的氧化反应和氧化磷酸化反应中，后者将 NADH 转化成 ATP、为甲醛同化途径（Pathway B）合成目标蛋白和生长细胞提供能量[12]。值得注意的是，在诱导期最后 20 h，甲醇周期控制（批次#3）的 OUR 依旧高于甲醇定值控制（对照，批次#1）的相应值，但 RQ 却下降到 0.4 以下，说明此时甲醇代谢的能量效率（NADH 的利用效率）有所增加、达到更高水平。这也是诱导后期 pIFN-α浓度能够持续增长的另一个重要原因。

2.3.3 利用甲醇周期诱导控制策略提高 pIFN-α诱导表达性能

根据前述的控制策略，先将甲醇浓度 ON-OFF 控制于较高水平（5-10 g/L），维持 7 h。然后，利用“诱导策略 II”的方法将 DO 大致控制在 20%左右，维持 4 h。重复实施上述策略、一共 6 个循环，总诱导时间为 79 h。使用该控制策略，pIFN-α蛋白浓度稳步上升，最终的细胞浓度、pIFN-α浓度和抗病毒活性分别达到 190 g-DCW/L、2.01 g/L 和 3.90×10^{7} IU/mL，明显高于其他两个批次（图 1）。使用甲醇周期诱导控制策略下的 pIFN-α抗病毒活性是甲醇定值控制策略（批次#1）相应值的 1.86 倍（图 1）。随着诱导的进行，目标蛋白 pIFN-α的 SDS-PAGE 条带（16 KDa）的强度（pIFN-α蛋白浓度，图 2-Run#3）明显增加，间接支持了 pIFN-α浓度大幅提升的结论。

前期研究表明[19]，甲醇利用慢型毕赤酵母（Mut^{S}）偏好较高浓度的甲醇诱导环境。本文采用的 pIFN-α生产菌属于 Mut^{S} 型菌株，较高浓度的甲醇对 pIFN-α诱导表达有利。甲醇诱导浓度过低，诱导强度不够；浓度过高则会产生“甲醇中毒”现象，最佳甲醇诱导浓度在 5-10 g/L 范围[16]。批次#1 的甲醇定值控制就是将甲醇浓度控制在 5-10 g/L 的最佳范围内，

但该策略存在细胞代谢活性逐渐下降和胞内甲醇逐渐积累等缺陷，即使在20℃诱导的条件下、pIFN-α浓度和抗病毒活性的提升幅度依旧非常有限[16]。所提出的甲醇周期诱导控制策略在较长的时段（7 h）、控制甲醇浓度在5-10 g/L的最佳范围内，强化诱导强度；而在较短的时段（4 h）提升DO水平到20%左右（甲醇浓度自动降到接近0 g/L），用来恢复细胞代谢活性和解除胞内甲醇浓度的积累，此时，细胞在消耗利用胞内甲醇的同时、依旧可以利用胞内残存甲醇进行有效诱导。因此，利用所提出的甲醇周期诱导控制策略来调控甲醇流加速率，可以起到恢复细胞代谢活性、降低胞内甲醇浓度和有效维持实质性的甲醇诱导的三重作用，其诱导效果比定值控制甲醇浓度在5-10 g/L最佳范围的策略更加优越，也突显出了该策略的新颖性和实用性。

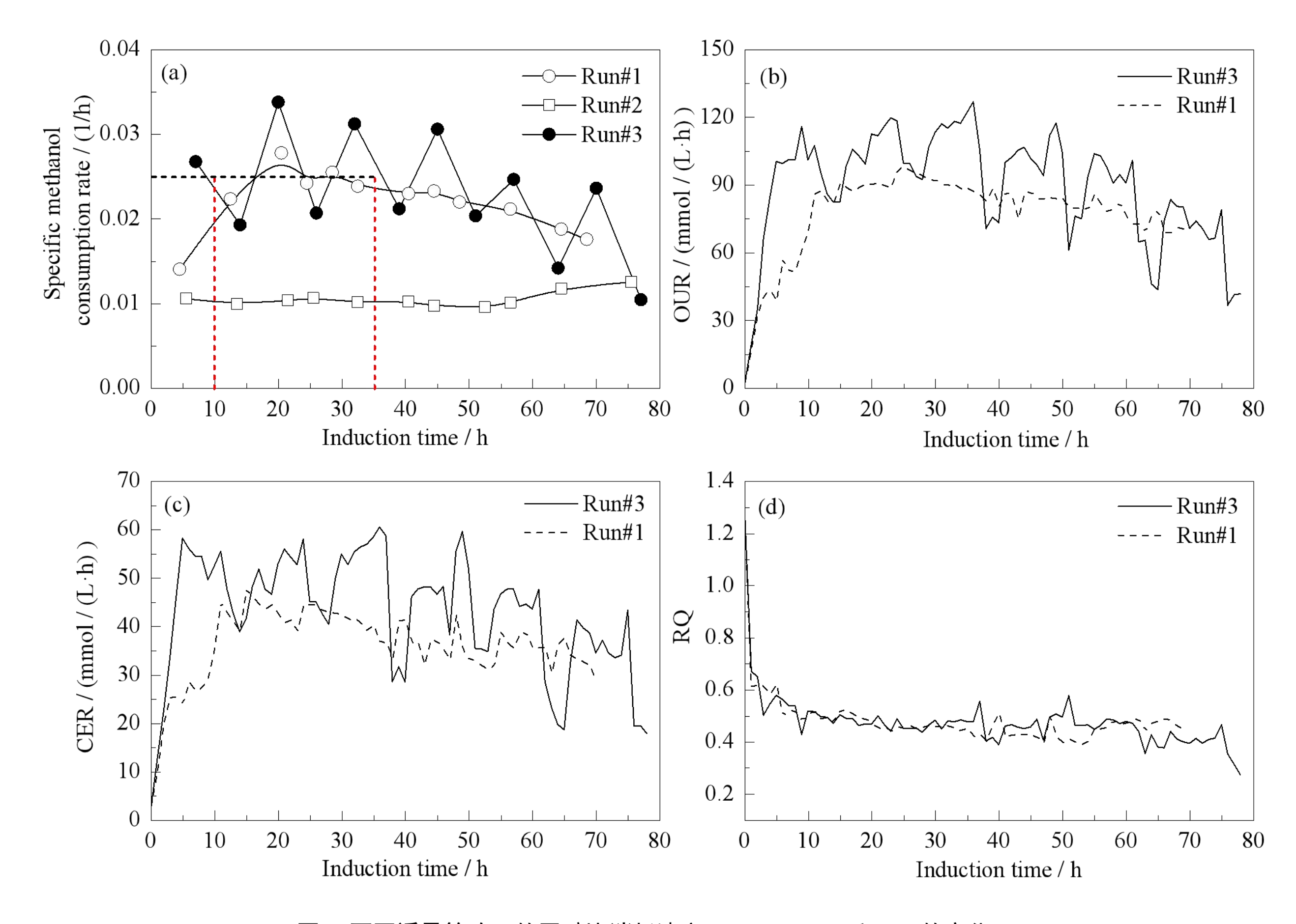


图5 不同诱导策略下的甲醇比消耗速率、OUR、CER和RQ的变化

Fig.5 Variations of specific methanol consumption rates, OUR, CER and RQ using different induction strategies

3 结论

本论文提出了一种新颖的甲醇周期诱导控制策略来改善毕赤酵母诱导表达pIFN-α的性能。20 ℃诱导条件下、以不同的周期长度将甲醇浓度和DO在“高/低水平”和“低/高水

平”来回切换：先将甲醇浓度 ON-OFF 控制于 5-10 g/L，维持 7 h；然后，通过降低甲醇流加速度、将 DO 大致控制在 20%左右，维持 4 h。重复实施上述方法、一共 6 个循环。所提出的甲醇周期控制策略可以：（1）提高并维持重组毕赤酵母的代谢活性和甲醇比消耗速度于高水平；（2）降低胞内甲醇浓度到极低水平（≤ 0.003 g/g-DCW）、消除了“甲醇中毒”效应、胞内积累的甲醇得到了充分利用；（3）最终 pIFN-α活性达到 3.90×10^7 IU/mL 的最高水平，是使用“次优”控制策略-甲醇浓度定值控制策略时、最终 pIFN-α 活性的 1.86 倍。

致谢 本研究得到江苏现代工业发酵协同创新中心和国家轻工业技术与工程一流学科（#2018-17）的支持。

参考文献

[1] Cheng C, Huang Y L, Yang S T. A novel feeding strategy for enhanced plasmid stability and protein production in recombinant yeast fed-batch fermentation. Biotechnology and bioengineering, 1997, 56(1) : 23-31.

[2] Ye K, Shijo M, Jin S, et al. Efficient production of vitamin B_{12} from propionic acid bacteria under periodic variation of dissolved oxygen concentration. Journal of fermentation and bioengineering, 1996, 82(5) : 484-491.

[3] 申渝，葛旭萌，白凤武. 初始条件对高浓度乙醇连续发酵过程的影响及振荡行为提高发酵效率的机理分析. 生物工程学报, 2010, 26(5) : 604-609.

Shen Y, Ge X M, Bai F W. Impact of fermentation system initial status on oscillations in very high gravity ethanol continuous fermentation process and analysis of fermentation efficiency improvement. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 26(5) : 604-609.

[4] 马善康，李强，顾小勇. 双碳源交替刺激毕赤酵母高效表达人尿激酶原. 过程工程学报, 2002, 5(2) : 448-451.

Ma S K, Li Q, Gu X Y. High expression of human pro-urokinase gene in *Pichia pastoris* through feeding two carbon sources alternatively. The Chinese Journal of Process Engineering, 2002, 5(2) : 448-451.

[5] Cos O, Ramón R, Montesinos J L, et al. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. Microbial cell factories, 2006, 5(1) : 17.

[6] Çelik E, Çalık P. Production of recombinant proteins by yeast cells. Biotechnology advances, 2012, 30(5) : 1108-1118.

[7] Idiris A, Tohda H, Kumagai H, et al. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. Applied microbiology and biotechnology, 2010, 86(2) : 403-417.

[8] Ding J, Gao M J, Hou G L, et al. Stabilizing porcine interferon - α production by *Pichia pastoris* with an ethanol on - line measurement based DO - Stat glycerol feeding strategy. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2014, 89(12) : 1948-1953.

[9] 高敏杰. 基于智能工程和代谢调控的毕赤酵母发酵过程控制研究. 无锡 ：江南大学, 2012.

Gao M J. Process control of *pichia pastoris* fermentation based on intelligent engineering and metabolic regulation. Wuxi : Jiangnan University, 2012.

[10] Suye SI, Ogawa A, Yokoyama S, et al. Screening and Identification of *Candida methanosorbosa* as Alcohol Oxidase-producing Methanol Using Yeast. Agricultural and Biological Chemistry, 1990, 54(5) : 1297-1298.

[11] Jia L Q, Tu T Y, Huai Q Q, et al. Enhancing monellin production by *Pichia pastoris* at low cell induction concentration via effectively regulating methanol metabolism patterns and energy utilization efficiency. PloS one, 2017, 12(10) : e0184602.

[12] Jin H, Liu G Q, Ye X F, et al. Enhanced porcine interferon-α production by recombinant *Pichia pastoris* with a combinational control strategy of low induction temperature and high dissolved oxygen concentration. Biochemical Engineering Journal, 2010, 52(1) : 91-98.

[13] Yu R S, Dong S J, Zhu Y M, et al. Effective and stable porcine interferon-α production by *Pichia pastoris* fed-batch cultivation with multi-variables clustering and analysis. Bioprocess and biosystems engineering, 2010, 33(4) : 473-483.

[14] Shi H, Shimizu K. On - line metabolic pathway analysis based on metabolic signal flow diagram. Biotechnology and bioengineering, 1998, 58(2 - 3) : 139-148.

[15] Schütte H, Flossdorf J, Sahm H, et al. Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. European Journal of Biochemistry, 1976, 62(1) : 151-160.

[16] 金虎. 毕赤酵母高效发酵生产猪α干扰素过程的优化与代谢调控. 无锡 ：江南大学, 2011.

Jin H. Fermentation optimization and metabolic regulation of porcine interferon-α expression by recombinant *pichia pastoris*. Wuxi : Jiangnan University, 2011.

[17] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS microbiology reviews, 2000, 24(1) : 45-66.

[18] Ponte X, Montesinos-Seguí J L, Valero F. Bioprocess efficiency in *Rhizopus oryzae* lipase production by *Pichia pastoris* under the control of P_{AOX1} is oxygen tension dependent. Process Biochemistry, 2016, 51(12) : 1954-1963.

[19] Jia L Q, Mpofu E, Tu T Y, et al. Transcriptional analysis for carbon metabolism and kinetic modeling for heterologous proteins productions by *Pichia pastoris* in induction process with methanol/sorbitol co-feeding. Process Biochemistry, 2017, 59 : 159-166.

Enhancing pIFN-α Production by *Pichia Pastoris* via Periodic Methanol Induction Control

YAN Jian JIA Lu-qiang DING Jian SHI Zhong-ping

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract In the process of expressing porcine interferon-α (pIFN-α) by methylotrophic *Pichia pastoris* under high cells density, methanol concentration is generally controlled at relatively high levels of 5-10 g/L with the dissolved oxygen concentration (DO) naturally declining to near 0% level. Heterologous proteins induction by *P. pastoris* is an extremely high aerobic system. If *P. pastoris* is subject to the environments of high methanol concentration and low DO for a long period, the cells metabolic activity and heterologous protein expression efficiency of *P. pastoris* would significantly deteriorate; intracellular methanol could severely accumulate, and the intracellular methanol can not be effectively oxidized by/energizing for methanol dissimilation route to synthesize the targeted protein. In this study, a novel periodic methanol induction control strategy was proposed and implemented at 20 ℃. During the induction period, methanol was firstly controlled at the high concentration level of 8-10 g/L with DO level naturally staying at ~0% for 7 h. Then raising/maintaining DO around 20% by reducing methanol feeding rate. By doing so, methanol concentration naturally reduced to low level of 0-1 g/L, and then the environment of high DO/low methanol concentration was created and kept for another 4 h. A total of 6 such cycles was repeated. By periodically shifting methanol concentration and DO in between “high/low” and “low/high” environments, the metabolic activity of *P. pastoris* could be recovered and maintained at higher levels for longer time; intracellular methanol concentration could be reduced to a very low level (≤ 0.003 g/g-DCW) but without deteriorating pIFN-α induction, the methanol toxicity was greatly relieved. As a result, pIFN-α activity reached the highest level of 3.90×10^{7} IU/mL, which was 86% higher than that using the traditional constant methanol concentration control strategy. The proposed periodic methanol induction control strategy showed its effectiveness in pIFN-α production and would supply the useful information/reference for other heterologous proteins fermentation processes.

Key words *Pichia pastoris* Methanol Periodic control DO pIFN-α